

Helligkeit durch lokale Rigidifizierung – LNA-verstärkte FIT-Sonden zur bildgebenden Darstellung von Ribonukleotidpartikeln in vivo**

Felix Hövelmann, Imre Gaspar, Simon Loibl, Eugeny A. Ermilov, Beate Röder, Jesper Wengel, Anne Ephrussi und Oliver Seitz*

Abstract: Bei der Analyse der RNA-Dynamik in lebenden Zellen werden üblicherweise transgene Methoden eingesetzt. Diese erfordern modifizierte RNAs und Zellen. Hingegen ermöglichen Hybridisierungs-Fluoreszenzsonden Untersuchungen an Wildtyp-Zellen. Wir haben Nuklease-resistente FIT („DNA-forced intercalation“)-Sonden entwickelt, in denen hohe Anstiege der Fluoreszenz durch Hybridisierung mit einer großen Helligkeit einhergehen, sodass einzelne Ribonukleotidpartikel (RNP) verfolgt werden können. Hierbei dient ein einzelner Thiazolorange(TO)-Interkalationsfarbstoff als Nukleobasensurrogat während eine benachbarte LNA („locked nucleic acid“)-Modifikation die Umgebung konformativ fixiert. Dies schließt Fluoreszenzabklingkanäle und erhöht so die Helligkeit von TO in Sonden-Ziel-Komplexen. Zwei FIT-Sonden reichen aus, um oskar-RNPs in lebenden Wildtyp-Oozyten von *Drosophila melanogaster* zu verfolgen.

Der Visualisierung von RNA bzw. RNPs sowie deren Dynamik in lebenden Zellen kommt eine Schlüsselrolle für die Zell- und Entwicklungsbiologie zu.^[1] Der Bedarf an bildgebenden Methoden hat die Entwicklung von molekularen Sonden angetrieben, die eine Hybridisierung mit komplementärer RNA durch verstärkte Fluoreszenz anzeigen können.^[2] Für den erfolgreichen Einsatz in der Lebendzell-Bildgebung müssen diese Sonden 1) bei Anwesenheit der Ziel-RNA eine starke Fluoreszenzerhöhung zeigen, um gebundene von ungebundenen Sonden zu unterscheiden; 2) Stabilität im intrazellulären Milieu aufweisen, was übli-

cherweise durch modifizierte Nukleotide erzielt wird, und 3) eine große absolute Helligkeit besitzen, damit sich auch Ziel-RNAs bei lokal geringer Konzentration in hoher räumlicher Auflösung deutlich von der zellulären Autofluoreszenz abheben.

Die ersten beiden Kriterien werden durch 2'-O-Me-RNA-modifizierte „Molecular Beacon“(MB)-Sonden, reaktive Sonden und FIT-Sonden (Abbildung 1 A) erfüllt.^[3] Wenn jedoch individuelle RNPs detektiert werden sollen, gilt die Helligkeit als begrenzender Faktor. Hauptsächlich aus diesem Grund werden RNPs in der Regel durch transgene Methoden visualisiert. Hierbei werden die Ziel-RNA mit angehängten Markierungssequenzen („Tags“) sowie fluoreszierende Fusionsproteine koexprimiert.^[4] Weit verbreitet ist vor allem das MS2-FP-System (FP = fluoreszierendes Protein), bei dem dutzende rekrutierte Fluorophore pro RNA-Molekül zu einer großen Helligkeit führen (Abbildung 1 B).^[5] Allerdings können die Verwendung von Sequenz-Tags sowie die künstliche Expression die RNA-Struktur bzw. die Dynamik der RNP-Biogenese beeinträchtigen. Dagegen eröffnen fluorigene Hybridisierungssonden die Möglichkeit, endogene, unveränderte RNA-Moleküle oder RNPs zu detektieren. Wahrscheinlich am wichtigsten ist, dass bei Untersuchungen von Spezies, die transgenen Methoden nicht oder nur bedingt zugänglich sind, der Einsatz chemischer Sonden die einzige Methode darstellt, mit der Informationen über die RNP-Dynamik erhalten werden kann.

[*] F. Hövelmann,^[†] S. Loibl, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Dr. I. Gaspar,^[†] Dr. A. Ephrussi
European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)

Dr. E. A. Ermilov, Prof. Dr. B. Röder
Institut für Physik, Humboldt-Universität zu Berlin
Newtonstraße 15, 12489 Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. J. Wengel
Department of Physics, Chemistry and Pharmacology
University of Southern Denmark Odense
Campusvej 55, 5230 Odense M (Dänemark)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und European Molecular Biology Laboratory unterstützt. LNA = „locked nucleic acid“, „konformativ fixierte Nukleinsäure“; FIT = „forced intercalation“, „erzwungene Interkalation“.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406022> zu finden.

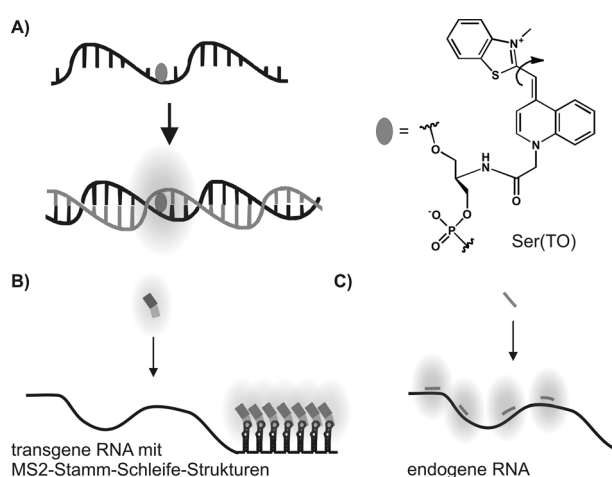


Abbildung 1. A) FIT-Sonden und Struktur des Ser(TO)-Nukleotids. Prinzip der Lebendzell-Bildgebung von B) haarnadelmarkierter transgener RNA durch GFP-MS2-Hüllproteine oder C) Wildtyp-RNA durch mehrere FIT-Sonden.

Wir nahmen an, dass eine geringe Anzahl (≤ 5) kurzer (< 20 nt) und besonders heller Fluoreszenzsonden, die an unterschiedliche Abschnitte derselben mRNA binden, ein Fluoreszenzsignal liefert, das die Darstellung endogener RNPs ermöglicht (Abbildung 1 C). Konventionelle MBs beruhen auf einer Konformationsänderung, durch die ein Chromophor von einem Fluoreszenzlöcher separiert wird.^[6] Dies kann ebenfalls durch unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen hervorgerufen werden.^[7] Zusätzlich begrenzt eine auch im gebundenen Zustand verbleibende Fluoreszenzlöschung die Helligkeit von MB-Sonden. Kürzlich berichteten wir über Löcher-freie FIT-Sonden (Abbildung 1 A).^[8] In diesen dient ein einzelner Farbstoff aus der Thiazolorange(TO)-Familie in einer Hybridisierungs-sonde als Basensurrogat. Als Einzelstrang zeigen FIT-Sonden eine geringe Fluoreszenz. Hybridisierung mit Ziel-RNA erzwingt die Interkalation des Farbstoffs, wodurch die Emission stark ansteigt.^[9] Um die Helligkeit der FIT-Sonden zu erhöhen, haben wir kürzlich den responsiven TO mit dem extrem hellen Oxazopyridinabkömmling JO kombiniert.^[10] Die dual markierten Sonden erwiesen sich in waschfreien FISH-Experimenten als sehr erfolgreich. Allerdings verhinderte die mangelnde chemische Stabilität, dass JO in chemisch modifizierte, Nuklease-resistente Sonden eingebaut werden konnte, wie sie für die Lebendzell-Bildgebung benötigt würden.

Im Streben nach hellen Hybridisierungs-sonden für die Detektion von RNPs in lebenden Zellen überdachten wir das Design von FIT-Sonden. In einer Umgebung geringer Viskosität induziert die Anregung des TO-Farbstoffs eine Rotation um die zentrale Methinbrücke, die den angeregten Zustand rasch entvölkert.^[11] Bei Hybridisierung wird der Farbstoff in den doppelhelikalen Basenstapel gezwungen. Die Umgebung hoher Viskosität behindert die Rotation.^[12] Die resultierende Verlängerung der Lebensdauer des angeregten Zustands lässt die Quantenausbeute ansteigen. Wir folgerten, dass die Helligkeit Ziel-gebundener FIT-Sonden gesteigert werden könnte, wenn es gelänge, die Viskosität in der Umgebung des TO-Farbstoffs weiter zu erhöhen. Wir nahmen an, dass dies durch eine konformative Fixierung realisiert werden könnte. In DNA-RNA-Duplexen nimmt die RNA eine A-Typ-Konformation ein, während der DNA-Strang weniger definiert erscheint.^[13] NMR-Untersuchungen,^[14] MD-Simulationen^[15] und Ladungstransferrmessungen^[16] belegen, dass der Einbau von LNA („locked nucleic acid“) in den DNA-Strang dessen A-Typ-Struktur verfestigt, weil der Zucker in der erforderlichen C3'-endo-Konformation fixiert wird (Abbildung 2).^[17] Die verstärkte Rigidität sowie die begleitende

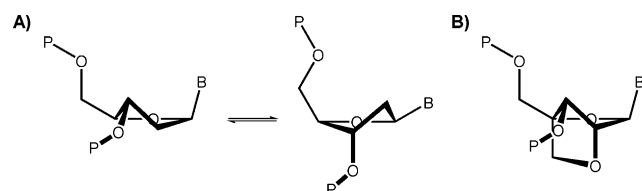


Abbildung 2. A) In Nukleinsäure-Duplexen können Nukleoside die C3'-endo- (links) und die C2'-endo-Konformation (rechts) einnehmen. B) LNA ist in der C3'-endo-Konformation fixiert.

Abnahme des Hubs pro Basenpaar, die durch LNA bewirkt werden, sollten das für Rotationen um die Methinbrücke benötigte Volumen verringern. Als Resultat sollte die Quantenausbeute der TO-Emission ansteigen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine DNA-FIT-Sonde, die gegen ein Segment der Neuraminidase-mRNA von H1N1-Influenza gerichtet ist, an unterschiedlichen Positionen mit LNA modifiziert (Abbildung 3 A). Die

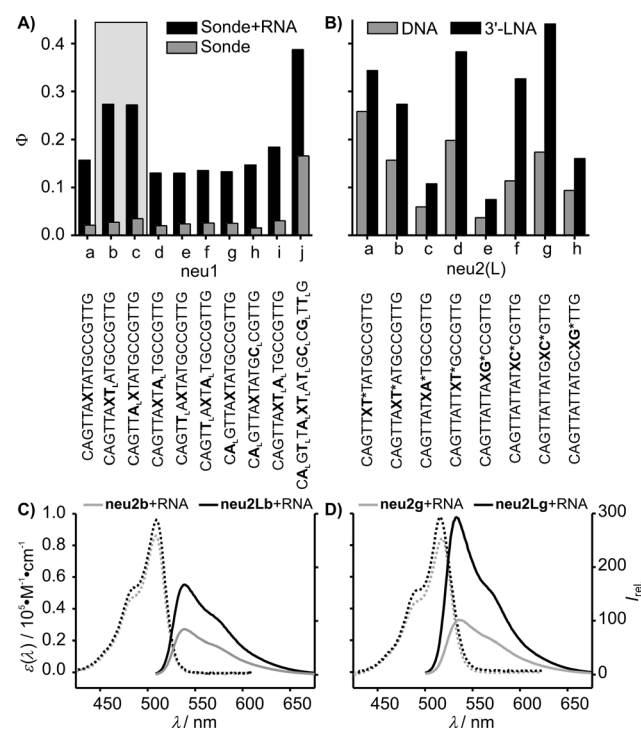


Abbildung 3. Vergleich der Quantenausbeuten A) vor (grau) und nach Hybridisierung mit Ziel-RNA CAACGGCAUUAUACUG (schwarz), einfache LNA-Markierung neben TO ist grau hinterlegt; B) im hybridisierten Zustand der FIT-Sonden. C, D) Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgezogen) im hybridisierten Zustand der DNA-Sonden (grau, $N^* = dN$) und der LNA-verbesserten Sonden (schwarz, $N^* = N_j$). Bedingungen: 0.5 μ M Sonden und 5 Äquiv. Ziel-RNA (falls zugesetzt) in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7) bei 37°C; $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{--}700$ nm, $\text{slit}_{\text{ex}} = 5$ nm, $\text{slit}_{\text{em}} = 5$ nm. (X = Ser(TO), LNA-Modifikationen sind mit tiefgestelltem L markiert).

TO-Position wurde konstant gehalten. Wir ermittelten UV/Vis- und Fluoreszenzspektren vor und nach Zugabe der Ziel-RNA. Durch das LNA-Monomer wurde die Quantenausbeute um 17–152% erhöht, vorausgesetzt, dass LNA in direkter Nachbarschaft zu TO platziert wurde (siehe grau markierter Bereich in Abbildung 3 A). Dies wurde sowohl für Einzel- als für Doppelstränge beobachtet. Der Fluoreszenzanstieg blieb daher weitgehend unverändert, wenn nicht mehrere LNA-Monomere gleichzeitig eingeführt wurden. Der „LNA-Effekt“ verschwand, sobald eines oder mehrere Nukleotide zwischen TO und LNA platziert wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass die verstärkte Fluoreszenzemission vornehmlich durch eine lokale, LNA-induzierte Verfestigung der Duplexstruktur erzielt wird.

Tabelle 1: Fluoreszenzlebenszeiten, Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten der DNA und LNA-modifizierten FIT-Sonden.

ON	τ (a) ^[a]				ϵ_{max} ^[b]	Φ ^[c]
	sehr schnell	schnell	mittel	langsam		
neu2b	0.047 (43)	0.29 (37)	1.00 (16)	3.16 (4)	82260	0.02
neu2Lb	0.040 (42)	0.27 (37)	1.00 (15)	3.31 (6)	92620	0.02
neu2b + RNA	–	0.23 (25)	1.22 (33)	3.15 (42)	86320	0.16
neu2Lb + RNA	–	–	0.99 (31)	3.53 (69)	96350	0.27
neu2d	0.055 (37)	0.38 (34)	1.20 (23)	2.70 (6)	79520	0.05
neu2Ld	0.080 (20)	0.49 (41)	1.30 (29)	3.20 (10)	95330	0.07
neu2d + RNA	–	–	0.99 (33)	2.85 (67)	79530	0.20
neu2Ld + RNA	–	–	1.50 (20)	3.64 (80)	96250	0.38
neu2g	0.050 (28)	0.40 (37)	1.00 (29)	2.70 (6)	83080	0.04
neu2Lg	–	0.13 (14)	1.36 (45)	2.55 (41)	96100	0.14
neu2g + RNA	–	–	0.94 (28)	2.96 (72)	85020	0.21
neu2Lg + RNA	–	–	1.00 (6)	4.15 (94)	98430	0.44

[a] τ = Fluoreszenzabklingzeit [ns] mit relativer Amplitude (a) der exponentiellen Regression in Klammern. [b] Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] des Absorptionsmaximums (513–518 nm). [c] Quantenausbeute.

Wir untersuchten die Robustheit des „LNA-Effekts“ und positionierten ein formales Dinukleotid, das aus dem TO-Nukleotid und einem benachbarten LNA-Monomer bestand, an acht verschiedenen Positionen eines 17-mer-Oligonukleotids. (Abbildung 3B). Wie bereits vormals berichtet, hängt die TO-Emission von der Sequenzumgebung ab.^[10] Allerdings wurde deutlich, dass der Einbau von LNA in jedem Fall eine Zunahme der Quantenausbeute (30–187 %) bewirkt.

Drei der acht Sonden, **neu2Lb**, **neu2Ld** und **neu2Lg**, wurden eingehender untersucht (Tabelle 1). Absorptionsmessungen belegten, dass ein benachbartes LNA-Monomer den Extinktionskoeffizienten von TO im Einzel- und Doppelstrang um 12–21 % vergrößert (siehe Abbildung 3C und 3D). Mit einem Maximalwert von $98000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ist die Extinktion um 56 % höher als die von freiem TO in Lösung.^[18] Obgleich der zugrundeliegende Mechanismus bisher nicht geklärt wurde, so scheint es plausibel, dass LNA Grundzustandswechselwirkungen zwischen TO und den Nukleobasen verstärkt.

Um den Einfluss von LNA auf den angeregten Zustand von TO zu untersuchen, wurden Fluoreszenzlebenszeiten (Tabellen 1, S1 und Abbildung S1) ermittelt.^[18] Die vier beobachteten Relaxationsprozesse wurden in sehr schnelle (0.04–0.08 ns), schnelle (0.13–0.49 ns), mittlere (0.99–1.59 ns) und langsame (2.13–4.15 ns) Abklingprozesse unterteilt. Durch Hybridisierung wurden die schnellen und sehr schnellen Prozesse unterbunden. Des Weiteren bewirkte LNA eine Verschiebung hin zu langsamen Prozessen. Deren Anteil wurde auf Kosten der „mittleren Prozesse“ von 60 % auf 81 % bei LNA-FIT-Sonden gesteigert (Tabellen 1, S1). Zusätzlich wurden die Lebenszeiten des langsamen Prozesses im Mittel von 2.99 ns auf 3.73 ns verlängert. Daraus resultierte eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer der LNA enthaltenden FIT-Sonden, was wiederum mit den erhöhten Quantenausbeuten korreliert. Die Daten aus UV/Vis-Spektroskopie sowie stationärer und zeitaufauflösender Fluoreszenzspektroskopie spiegeln die literaturbekannte Verfestigung wider, die durch den Einbau von LNA erreicht wird und

so möglicherweise Wechselwirkungen zwischen TO und benachbarten Nukleobasen fördert. Dies sollte die Entvölkerung des angeregten Zustands durch Rotationsprozesse unterbinden.

Für bildgebende Untersuchungen von *oskar*-mRNA enthaltenden RNPs in lebenden Oozyten von *Drosophila melanogaster* entwarfen wir einen Satz von Hybridisierungssonden.^[19] Um den Abbau der Ziel-RNA durch RNase-H zu unterbinden, wurden vier LNA-Modifikationen eingefügt. Die Sonde **osk1b** zeigte hervorragende Helligkeit bei Hybridisierung mit der Ziel-RNA in vitro, jedoch war die Stabilität gegenüber DNase-I-Verdau gering, sodass das Signal in vivo innerhalb von 45 min verblasste (Tabelle S2, Abbildung S2). Dabei ist zu beachten, dass FIT-Sonden – im Gegensatz zu MBs – bei enzymatischem Verdau keine falsch positiven Signale liefern (ein Vergleich ist in Lit. [9b] zu finden). Die vollständig 2'-O-Me modifizierte FIT-Sonde **osk1c** erwies sich als deutlich stabiler. Responsivität und Helligkeit dieser Sonde waren jedoch deutlich verringert. Die Einführung eines einzelnen LNA-Monomers neben dem TO-Nukleotid in Multi-2'-O-Me-RNA stellte die Responsivität wieder her (Abbildungen S2, S3, Tabellen 2, S3). Optimale Ergebnisse hinsichtlich Stabilität und Fluoreszenzeigenschaften wurden erzielt, wenn TO-LNA-Dinukleotid und 2'-O-Me-Segmente in einem Abstand von einem Nukleotid arrangiert wurden (**osk1d**).

Responsivität und Helligkeit dieser Sonde waren jedoch deutlich verringert. Die Einführung eines einzelnen LNA-Monomers neben dem TO-Nukleotid in Multi-2'-O-Me-RNA stellte die Responsivität wieder her (Abbildungen S2, S3, Tabellen 2, S3). Optimale Ergebnisse hinsichtlich Stabilität und Fluoreszenzeigenschaften wurden erzielt, wenn TO-LNA-Dinukleotid und 2'-O-Me-Segmente in einem Abstand von einem Nukleotid arrangiert wurden (**osk1d**).

Tabelle 2: Vergleich von DNA, LNA, 2'-O-Me und Gapmer-FIT-Sonden zur Detektion von *oskar*-mRNA.

ON	Sequenz ^[a]	Φ	Φ/Φ_0	Br ^[b]
osk1a	<u>83</u> GACTTAAGATAXTAGGTTTGGCG ₁₀₆	0.22	11.7	9.7
osk1b	T ₁ AAG ₁ ATAXT ₁ AGGT ₁ T	0.36	13.4	16.4
osk1c	GACTTAAGATAXTAGGTTTGGCG	0.12	4.2	4.9
osk1d	TTAAGATAXT ₁ AGGTTTGG	0.34	13.2	16.6
osk2	<u>2642</u> GCGGAAAAGXT ₁ TGAAGAGA ₂₆₁₆	0.40	7.6	19.7
osk3	<u>2229</u> CTCGTTTCAATAACXT ₁ GCA ₂₂₁₁	0.28	4.3	14.1
osk4	<u>1462</u> ACCGATXT ₁ TGTTCCAGAAC ₁₄₄₄	0.28	5.8	13.1
osk5	<u>2197</u> CGGTTTCTCGXT ₁ TTGGGT ₂₁₇₉	0.43	8.0	21.2
osk6	<u>822</u> GTGAGXT ₁ TTCGATAITCAC ₈₀₄	0.42	6.1	21.1

[a] Unterstrichene Buchstaben repräsentierten 2'-O-Me-Nukleotide; tiefgestelltes „L“ repräsentiert LNA-Nukleotide und X markiert Ser(TO); tiefgestellte Nummern geben die Position des Segmentabschnitts der *oskar*-RNA an. [b] Br = Helligkeit in $\text{mL mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Die „1-Nt-Abstand-Regel“ (Gapmer) wurde auf weitere, für die Detektion von *oskar*-mRNA bestimmte Sonden (**osk2–6**) übertragen (Tabellen 2, S4, S5). Die Zielsegmente für **osk1–5** wurden so gewählt, dass eine Interferenz mit potenziellen Proteinbindungsstellen oder der RNA-Sekundärstruktur vermieden wurde. Anhand unterschiedlicher Kombinationen testeten wir die LNA-verstärkten Sonden in einem Vergleich mit dem *oskMS2*(10x)-GFP-System.^[20] Dazu ermittelten wir mit dem hintergrundkorrigierten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR, beschreibt die normalisierte Helligkeit der injizierten Sonden) sowie dem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SBR oder Kontrast) zwei Schlüsselpara-

meter, welche die Leistungsfähigkeit in der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Partikeln und Partikel-ähnlichen Objekten bestimmen (PLFs, Abbildung S4).

Bereits eine einzige FIT-Sonde genügte, um am posterioren Pol lokalisierte *oskar*-mRNA zu detektieren. Jedoch konnten geringere Mengen an RNA, insbesondere bewegliche, in der Eikammer verteilte RNPs, nicht aufgelöst werden. Eine RNP-Verfolgung war nicht möglich (Video S1). Um die uneingeschränkte Detektion von *oskar*-Transportpartikeln geringer *oskar*-mRNA-Beladung zu ermöglichen, wurden Mischungen verschiedener „Gapmer“-FIT-Sonden in 5–45 μM Konzentration injiziert (1–4 % des Oozytenvolumens). Im direkten Vergleich der Signalintensitäten und der SBR stellten wir fest, dass 3–4 FIT-Sonden im Mittel vergleichbare Fluoreszenzsignale lieferten wie die 10 GFP-Moleküle, die ein einzelnes *oskMS2*(10x)-mRNA-Molekül markieren (Abbildung 4A', A'' und B). Aufgrund der ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften von GFP und TO liegt die Vermutung nahe, dass die meisten detektierten RNPs eine vergleichbare Menge an endogener und transgener (durch GFP detektier-

barer) RNA enthalten.^[21] Das SBR, das im TO-Kanal von injizierten Mischungen gemessen wurde, erschien deutlich geringer als das SBR im GFP-Kanal vom *oskMS2*-System (Abbildungen 4B, S4E). Dies liegt daran, dass ungebundenes GFP in den entfernten Kernen der Schwesterzellen gelagert wird, während ungebundene Sonden verteilt in der Eikammer vorliegen. Eine Reduzierung der Anzahl auf zwei FIT-Sonden verminderte das Hintergrundsignal merklich (Abbildung 4A). Hierbei wurde das SBR soweit gesteigert, dass es den Wert des *oskMS2*-GFP-Systems übertraf (Abbildung 4B).^[22] Für einen direkten Vergleich der FIT-Sonden mit dem *MS2*-GFP-System wurden 2–4 Sonden in *oskMS2*-GFP-exprimierende Oozyten injiziert. Trotz der suboptimalen spektralen Einstellungen zur Detektion beider Reporter (siehe Legende zu Abbildung 4) wurde eine nahezu perfekte Korrelation beider Signale beobachtet (Abbildung 4C,D und Video S2).

Die Beweglichkeit von *oskar*-RNPs wurde mithilfe einer computergestützten Methode zur Verfolgung fluoreszierender Partikel analysiert.^[23] Unabhängig von der Anzahl der injizierten Sonden konnten die wichtigsten Beweglichkeitsparameter, die im TO-Kanal bestimmt wurden, kaum von den Parametern unterschieden werden, die mithilfe des GFP-Kanals in injizierten und in nichtinjizierten Kontroll-Oozyten ermittelt wurden (Tabelle 3 und Abbildung S5E–G). Der

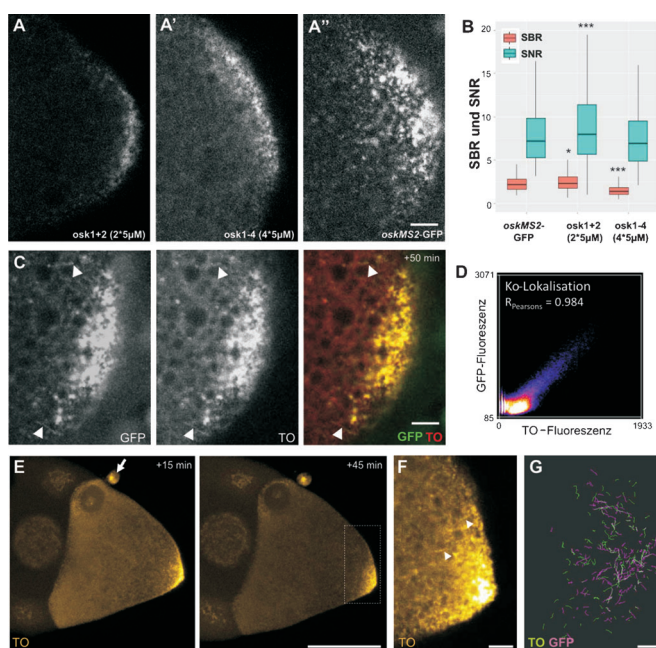


Abbildung 4. A) Konfokale Mikroskopiebilder von Wildtyp (w^{1118})-Oozyten 15 min nach Injektion der FIT-Sonden (A,A') oder Oozyten, die *oskMS2*-GFP exprimieren und in denen nichts injiziert wurde (A''). B) Optische Eigenschaften der PLFs. C und F) Projektion von zehn sukzessiven Bildern von *oskMS2*-GFP-exprimierenden Oozyten bzw. Wildtyp-Oozyten (siehe auch die Videos S2 und S3; 1.6 Bilder pro Sekunde), in die eine Mischung aus *osk1* + 2 + 4 (je 15 μM) injiziert wurde. Bilder wurden nahe dem posterioren Pol aufgenommen (siehe E). Pfeilköpfe zeigen bewegliche *oskar*-RNPs an. D) Kolokalisation von GFP- und TO-Fluoreszenz in (C). E) Wildtyp-Oozyt 15 und 45 min nach der Sonden-Injektion (*osk1* + 2 + 4). G) Die *oskar*-RNP-Trajektorien von sechs Oozyten, die mithilfe des *oskMS2*-GFP-Systems (dunkelgrau) und der FIT-Sonden (*osk1* + 2 + 4, hellgrau) gemessen wurden. Überlappende Spuren sind weiß dargestellt. Bedingungen: (A, A', E, F) $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525\text{--}625 \text{ nm}$, (A'') $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{--}600 \text{ nm}$. (C) TO: $\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535\text{--}625 \text{ nm}$, GFP: $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480\text{--}520 \text{ nm}$. Die Maßstabsleisten repräsentieren 5 μm (A, C, F und G) bzw. 50 μm (E).

Tabelle 3: Mobilitätsparameter der RNPs bei Visualisierung durch MCP-GFP oder injizierte FIT-Sonden.

Genotyp	<i>oskMS2</i>	<i>oskMS2</i>	<i>oskMS2</i>	w^{1118}
Bedingungen	nichtinjiziert	injiziert	injiziert	injiziert
Markierung	GFP	GFP ^[a]	TO ^[a]	TO
Spuren/Oozyten	133/4	158/6	139/6	238/11
Bewegliche	23.4 ± 2.5	23.1 ± 2.7	22.8 ± 2.5	20.2 ± 2.3
Fraktion [%] ^[b]				
Wegstrecke ^[c] [μm]	1.78 ± 1.31	1.82 ± 1.11	1.67 ± 0.98	1.80 ± 1.06
Dauer ^[c] [s]	4.80 ± 3.65	5.26 ± 3.66	$4.1 \pm 3.25^*$	5.02 ± 3.92
Geschwindigkeit ^[c] [$\mu\text{m s}^{-1}$]	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	$0.45 \pm 0.01^*$	0.40 ± 0.01

Eine Mischung aus *osk1* + 2 + 4 (je 15 μM) wurde in Stufe-9-*oskMS2*-GFP- und Wildtyp(w^{1118})-Oozyten injiziert und nach 35–45 min untersucht. [a] GFP- und TO-Signale derselben *oskMS2*-GFP Oozyten. [b] Mittel \pm Standardfehler des Mittel. [c] Mittel \pm Standardabweichung. * signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu nichtinjizierten *oskMS2*-GFP-Oozyten.

Anteil beweglicher Partikel und die zurückgelegte Wegstrecke waren identisch. Bemerkenswerterweise überlappten bei der Partikel-Verfolgung trotz der Analyse derselben Oozyten und des hohen Grades an Kolokalisation (Abbildung 4D) lediglich 40 % der GFP- und TO-Signale (Abbildung 4G). Dies und die nahezu identische Anzahl verfolgter RNPs (Tabelle 3) suggerieren, dass, obwohl eine große Zahl GFP-positiver *oskar*-RNPs auf dem TO-Kanal nicht detektiert wurde – möglicherweise wegen der suboptimalen Anregung bei 525 nm, die erforderlich war, um GFP- und TO-Signale aufzulösen –, durch FIT-Sonden doch zahlreiche endogene mRNA enthaltende RNPs erkannt werden konnten, die sich der Detektion durch das *MS2*-GFP-System entziehen. Der Unterschied in der Anzahl „detektierbarer RNA-Moleküle“

könnte ebenfalls erklären, warum 3–4 FIT-Sonden eine ähnliche Helligkeit liefern wie 10xGFP.

Die Verwendung LNA-verbesserter FIT-Sonden ermöglichte die Analyse der mRNP-Beweglichkeit in Wildtyp-Oozyten, die kein *oskMS2*-GFP exprimieren (Abbildung 4 E,F, Video S3). Mit 3–4 LNA-verbesserten Gapmer-Sonden einer Anfangskonzentration von 40–45 μM beobachteten wir in den Oozyten eine nahezu identische Anzahl und eine ähnliche Verteilung von *oskar*-Partikeln wie in nichtinjizierten GFP-Kontrollen (Abbildung S5 A).^[24] Besonders hervorzuheben ist, dass die Beweglichkeit der *oskar*-RNPs keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Detektionssystemen zeigte (Tabelle 3, Abbildung S5 E–G). Diese Resultate validieren LNA-Gapmer-Sonden für In-vivo-Untersuchungen des mRNP-Verhaltens.

Hybridisierungssonden wurden bereits zur Analyse von RNPs in vivo verwendet. Mhlanga et al. injizierten vier MB-Sonden und beobachteten den Transport von *oskar*-mRNA in ungewöhnlich großen RNPs, die mehrere hundert mRNA-Moleküle enthielten.^[25] Diese großen RNPs zeigten im Vergleich zum *oskMS2*-GFP-System eine ca. zehnfach reduzierte Beweglichkeit.^[20,23] Solch große Granula nichtlokalisierter *oskar*-mRNA werden in Eikammern unter Stress durch Nahrungsentzug beobachtet.^[26] Für die bildgebende RNP-Darstellung scheint es daher geboten, die Bedingungen, unter denen zugesetzte Nukleinsäuren gegen endogen exprimierte RNA gerichtet werden, sorgfältig zu erkunden.

Sonden müssen offensichtlich so gewählt werden, dass sie nicht mit der physiologischen RNP-Biogenese interferieren. Andererseits könnte sich eine gezielte Störung der Ziel-RNA als ein wertvoller Ansatz für die Analyse der RNA-Struktur und der Proteinbindungsstellen erweisen. Zur Überprüfung dieses Konzepts wurde *osk6* so entworfen, dass es den 6 nt langen proximalen Stamm des „spliced *oskar* localization element“ (SOLE) aufbricht (Abbildung 5 A). In vorhergehenden Arbeiten konnte durch genetische Manipulation der

Dies belegt, dass die Sonde in vivo mit ihrem Zielmolekül hybridisieren kann. Wie bereits vorher diskutiert, erschien das Signal einer einzelnen Sonde zu schwach, um individuelle RNPs zu detektieren (vergleiche *osk1d* und Video S1 sowie *osk3* in Abbildung S6B). Jedoch gelang mit dem mCherry-Reportersystem die Analyse der Beweglichkeit der *oskar*-RNPs, die durch *osk6* deutlich beeinträchtigt wurde. Im Unterschied zu den übrigen Sonden wurden eine drastisch verringerte Anzahl und deutlich verkürzte Wegstrecken der mobilen RNPs beobachtet (Abbildung 5 B,C). Dieses Resultat zeigte eine große Ähnlichkeit zu den Ergebnissen von Untersuchungen zur genetischen Manipulation der SOLE-Struktur von Ghosh, Marchand et al.^[21]

Zusammenfassend haben wir eine Methode zur Verbesserung der Helligkeit fluorogener Hybridisierungssonden (FIT-Sonden) entwickelt, die ein einzelnes, umgebungsempfindliches Thiazolorange(TO)-Nukleotid enthalten. Die Methode basiert auf dem Einbau eines benachbarten LNA-Nukleotids. Die damit erzielte lokale Verfestigung der Duplexstruktur schließt Relaxationskanäle, durch die der angeregte Zustand von TO in Abwesenheit des LNA-Monomers entvölkert würde. Die vorteilhaften Merkmale – Stabilität gegen Nukleasen, schwache Fluoreszenz im einzelsträngigen Zustand, sehr helle Emission bei Bindung an die Ziel-RNA – die für LNA-verbesserte Gapmer-FIT-Sonden charakteristisch sind, ermöglichten die bildgebende Analyse der Dynamik von kleinen, *oskar*-mRNA beinhaltenden Ribonukleotidpartikeln in *Drosophila-melanogaster*-Oozyten. Die Signal-zu-Rausch- und Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse sowie die gemessenen RNP-Beweglichkeiten halten einem Vergleich mit transgenen RNA-Detektionsmethoden stand, die, nach dem heutigen Stand der Technik, auf der Verwendung von RNA-Tags und der Expression fluoreszierender Fusions-MS2-Hüllproteine beruhen. FIT-Sonden sind die ersten fluorogenen Hybridisierungssonden, die – im Gegensatz zu Untersuchungen mit Molecular Beacons von Mhlanga et al.^[25] – die Detektion von kleinen, mobilen RNPs gestatten. Basierend auf diesen Ergebnissen erwarten wir, dass sich LNA-verstärkte FIT-Sonden besonders zur Anwendung in Organismen als nützlich erweisen, die transgenen Methoden gegenwärtig nicht zugänglich sind.

Eingegangen am 8. Juni 2014

Online veröffentlicht am 28. August 2014

Stichwörter: Fluoreszenzsonden · Mikroskopie · mRNA · Oligonukleotide · Ribonukleoproteinpartikel

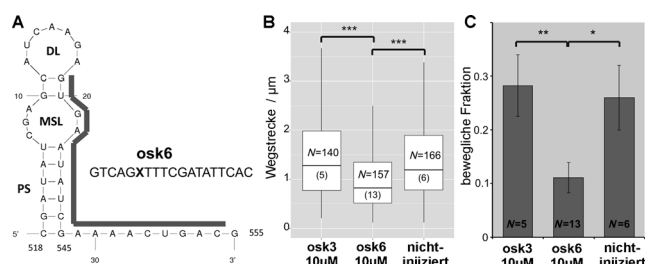


Abbildung 5. Effekt von *osk6* auf die *oskar*-mRNP-Beweglichkeit.

A) Strukturvorhersage des „spliced *oskar* localization element“ und das Zielsegment von *osk6*. B) Wegstrecke und C) Anteil beweglicher *oskar*-mRNPs 60 min nach Injektion. *** indiziert $p < 0.001$ eines paarweisen Mann-Whitney-Test (D), * und ** indizieren $p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$, in zwei Student-T-Tests.

oskar-mRNA gezeigt werden, dass dieses Strukturelement für die Beweglichkeit und die korrekte Lokalisation von *oskar* essenziell ist.^[23] Die Injektion von *osk6* in *oskMS2*-mCherry exprimierende Oozyten ermöglichte die Detektion von bereits lokalisierter RNA am posterioren Pol (Abbildung S6A).

- [1] a) T. T. Weil, R. M. Parton, I. Davis, *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 380–390; b) V. Marchand, I. Gaspar, A. Ephrussi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 202–210.
- [2] a) G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25–47; b) S. Tyagi, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 331–338.
- [3] a) D. P. Bratu, B. J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13308–13313; b) Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492–6497; c) R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021–16023; d) H. Abe, J. Wang, K. Furukawa, K. Oki, M. Uda, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bio-*

- conjugate Chem.* **2008**, *19*, 1219–1226; e) S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931–1934; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1972–1975; f) S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2051–2060; g) A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski, R. H. Hudson, O. Seitz, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2152–2167.
- [4] a) B. A. Armitage, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 806–812; b) M. Baker, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 787–790.
- [5] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, R. M. Long, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 437–445.
- [6] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [7] J. J. Li, X. Fang, S. M. Schuster, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1049–1052; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1091–1094.
- [8] a) O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2203–2206; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2340–2343; b) O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938–2939; c) O. Köhler, D. Venkatrao, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69–77; d) E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555–9559; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9697–9701.
- [9] a) L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2439–2448; b) F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2072–2081.
- [10] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19025–19032.
- [11] a) V. Karunakaran, J. L. Perez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernstring, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954–2962; b) L. G. Lee, C.-H. Chen, L. A. Chiu, *Cytometry* **1986**, *7*, 508–517; c) J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39–51.
- [12] a) G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710–5718; b) A. Sanchez-Galvez, P. Hunt, M. A. Robb, M. Olivucci, T. Vreven, H. B. Schlegel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2911–2924; c) A. Yartsev, J.-L. Alvarez, U. Åberg, V. Sundström, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 281–289.
- [13] M. Petersen, K. Bondensgaard, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5974–5982.
- [14] a) K. E. Nielsen, S. K. Singh, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 228–238; b) M. Petersen, C. B. Nielsen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, K. Bondensgaard, S. K. Singh, V. K. Rajwanshi, A. A. Koshkin, B. M. Dahl, J. Wengel, J. P. Jacobsen, *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 44–53; c) K. E. Nielsen, J. Rasmussen, R. Kumar, J. Wengel, J. P. Jacobsen, M. Petersen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 449–457.
- [15] a) A. Ivanova, G. Jezierski, N. Rosch, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 414–421; b) A. Ivanova, N. Rosch, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 9307–9319.
- [16] U. Wenge, J. Wengel, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10026–10029; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10168–10172.
- [17] a) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401–5404; b) A. A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V. K. Rajwanshi, S. K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13252–13253.
- [18] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300–310.
- [19] a) A. Ephrussi, L. K. Dickinson, R. Lehmann, *Cell* **1991**, *66*, 37–50; b) J. Kim-Ha, J. L. Smith, P. M. Macdonald, *Cell* **1991**, *66*, 23–35.
- [20] V. L. Zimyanin, K. Belaya, J. Pecreaux, M. J. Gilchrist, A. Clark, I. Davis, D. St Johnston, *Cell* **2008**, *134*, 843–853.
- [21] a) H. Jambor, C. Brunel, A. Ephrussi, *RNA* **2011**, *17*, 2049–2057; b) M. Chekulaeva, M. W. Hentze, A. Ephrussi, *Cell* **2006**, *124*, 521–533.
- [22] Obwohl das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Partikelmerkmale, die durch diese Kombination an FIT-Sonden detektiert wurden, vergleichbar blieb (Abbildung 4B), war die nicht hintergrundkorrigierte Helligkeit (Abbildung 4A und A'') deutlich geringer als beim *oskMS2*-GFP-System (Abbildung 3A und A'').
- [23] S. Ghosh, V. Marchand, I. Gaspar, A. Ephrussi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 441–449.
- [24] Die Qualität der Bildgebung mit FIT-Sonden war dem *oskMS2*-GFP-System geringfügig unterlegen, insbesondere bei Beachtung des Hintergrundsignals (siehe z.B. Abbildungen 4E, S3E und S4C). Dies war zu erwarten, da freie MCP-GFP-Moleküle im Kern der entfernten Schwesterzellen akkumuliert werden, während injizierte, ungebundene Sonden homogen in der Zelle verteilt vorliegen.
- [25] M. M. Mhlana, D. P. Bratu, A. Genovesio, A. Rybarska, N. Chenouard, U. Nehrass, J. C. Olivo-Marin, *PloS one* **2009**, *4*, e6241.
- [26] Y. Shimada, K. M. Burn, R. Niwa, L. Cooley, *Dev. Biol.* **2011**, *355*, 250–262.